

Studies on Film-forming Wine Yeasts (I)
On Film Formation and Distribution of Wine Yeasts

Shōji GOTŌ (Inst. Fermentation, Yamanashi Univ.)

Film formation and distribution of wine yeasts isolated from grape musts were investigated. The isolated strains were divided into three groups as follows by their ability to form films on various media, viz. simple synthetic medium (SM), malt extract (ME), artificial medium supplemented with yeast extract (YEA), and wine medium (WM).

Group 1 includes the strains belonging to *Pichia*, *Candida*, etc. which form true films on all the media:—Film-forming yeasts.

Group 2 includes the strains belonging to *Saccharomyces* or other genera which form pseudofilms on YEA and WM:—Pseudofilm-forming yeasts.

Group 3 includes the strains which do not form any film on all the media:—Film-lacking yeasts.

The ratios of the group 2 and that group together with the group 1 to total isolates were about 20% and 37% respectively. The 106 strains isolated were classified into 6 genera, 14 species and 1 variety. Almost all strains of the group 2 belonged to the genus *Saccharomyces*, particularly *S. oviformis* was widely distributed, and reached 40% of them.

103 strains of wine yeasts maintained in stock cultures (*Saccharomyces*), which were reinvestigated, resembled the isolated strains in the film formation and distribution.

Studies on Film-forming Wine Yeasts (II)
Taxonomic Studies of Isolated Wine Yeasts

Shōji GOTŌ (Inst. Fermentation, Yamanashi Univ.)

106 strains of wine yeasts isolated from grape musts, particularly pseudofilm-forming strains, were studied from taxonomic point. They were identified according to the LODDER and VAN-RIJ system as follows:

<i>S. cerevisiae</i>	24	<i>P. membranaefaciens</i>	5
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	4	<i>C. mycoderma</i>	3
<i>S. oviformis</i>	11	<i>C. krusei</i>	5
<i>S. fermentati</i>	1	<i>C. tropicalis</i>	1
<i>S. rosei</i>	12	<i>Kl. apiculata</i>	8
<i>S. chevalieri</i>	3	<i>Rh. glutinis</i>	3
<i>S. bayanus</i>	8	<i>T. bacillaris</i>	16 strains
<i>S. steineri</i>	2		

A few morphological differences were found between pseudofilm-forming strains and film-lacking ones. In the former the streak cultures were generally dull and rough, and protuberances resembling conjugation tubes were formed in the sporulating cells, but in the latter the cultures were shiny and smooth, and their cells formed no protuberances in the sporulation.

The pseudofilm-forming strains formed a pellicle on YEA in 2~3 days and the cells in it had a tendency to become round and larger and to aggregate in chains.

LIBRARY
18 FEB 1993
Journal of Fermentation Technology Vol. 37 No. 9 1993

醸 酵 工 学 雑 誌 第 37 卷 第 9 号

大 阪 醸 造 学 会 (昭和34年9月15日発行)

産膜性のブドウ酒酵母について (第1報)

ブドウ酒酵母の産膜性とこれらの分布

後 藤 昭 二 (山梨大学醸酵研究所)

緒 言

ブドウ酒の貯蔵中その表面にいわゆる産膜酵母が繁殖して香味の汚染を行なうことは古くから知られている。パスツール以来多くの研究者¹⁾²⁾³⁾によつてこれが *Pichia*, *Kloeckera* 又は *Candida* などがその主体をなしていることが解明されて来ている。著者⁴⁾も先に我国のブドウ酒に於ける産膜酵母の研究を行ないその主体が *Pichia* 及び

Candida などである事を知つた。しかし乍らスペインのシェリー酒或はフランスのアルボイス地方の黄色ブドウ酒²⁾の様に、直接産膜性の酵母の関与によつてブドウ酒が製造される場合もある。これらの場合の産膜性酵母は *Pichia* とか *Candida* 等のいわゆる産膜酵母とは異なり、HOHL など⁴⁾によつて明らかにされた様に *Saccharomyces* 及び *Torulopsis* 等がその主体をなしている。

HOHL らの分離したシェリー酵母 Jerez No. 5 を先年東大有馬教授を通じて分与されたが、これは *Pichia*, *Hansenula* 或は *Candida* 等のいわゆる産膜酵母とは異なり、含糖又は含アルコール等の有機或は合成培地に於ては完全な皮膜形成がない。しかしアルコール15%以下のブドウ酒には良く産膜する。そして又著者は酵母エキスをを用いた人工培地 (YEA) に於ても良く産膜することを知つた。ところでブドウ酒培地或いは YEA を用いることにより、一般のブドウ酒酵母中にもシェリー酵母類似の産膜性を示す酵母の存在することが解つた。

目下著者はこの様な産膜性のブドウ酒酵母について研究を進めているが、ここに分離酵母及び保存中のブドウ酒酵母に於けるこれらの分布状態について報告する。

I. 産膜試験用培地について

培地・第1表に表示した様な7種類の培地を用いた。

使用菌株・当研究所に於て分離又は保存中の7株を用いた (Table 2)。

各培地は中型試験管 (長16.0, 経1.8cm) に6cc宛分注し 10 dl, 10 分間殺菌する。唯し YEA では YE を先に殺菌した後アルコールを3%になる様に加える。WMは75°C, 30分間の殺菌である。新鮮な麦芽汁寒天の斜面培養より直接接種を行なつた。培養温度は20°C, 2週間まで観察した。

結果・産膜性試験の結果は第2表に示した。この結果から解る様に *Pichia*, *Candida* 及び *Hansenula* は各培地に良く産膜している。ただし WM では産膜に要する日数が長く、*Hansenula* は遂に産膜しなかつた。Sherry yeasts (J-5), *S. cerevisiae* (CRUESS 66) 及び *S. fermentati* (WF-107) は KE 及び ME では醸酵終了後非常に不安定な酵母環又は島嶼を作るのみであるが YEA, YEG 及び WM では良く産膜した。*S. cerevisiae* の中でも OC-2 はいづれの培地にも産膜せず非産膜性の酵母とみなされる。SM ではいわゆる産膜酵母 *Pichia*, *Candida* 及び *Hansenula* のみが産膜し、他の酵母は全然産膜しない。

Table 1 Medium used for the investigation of film formation

Sign	Contains		
SM	Glucose	1.0%	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.01
	KH ₂ PO ₄	0.1	Yeast ext. one drop
KE	Koji ext. (Brix. 7)		
ME	Malt ext. (Brix. 7)		
YE-basic medium			
	Yeast ext. (Oriental Yeast KK)	0.1%	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.07
	KH ₂ PO ₄	0.1	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.01
YEA	YE+Et-OH	3.0%	
YEG	YE+Glucose	0.2%	
WA	Wine (Delaware 1954, Alcohol 8%)		
	pH is adjusted to 3.2 with HCl,		
	WM is not adjusted.		

Table 2. Film formation by various yeasts on different media

Medium	SM	KE	ME	YEA	YEG	WM
Yeasts						
<i>T. colliculosa</i> J-5 ²⁾	—	+	+	+ ₂	+ ₃	+ ₆
<i>S. cerevisiae</i> CRUESS 66 ³⁾	—	+	+	+ ₂	+ ₄	+
// OC-2 ^{3), 9)}	—	+	+	+	+	—
<i>S. fermentati</i> WF-107 ⁴⁾	—	+	+	+ ₁	+ ₂	+ ₃
<i>P. membranaefaciens</i> WF-1 ⁴⁾	+ ₂	+ ₁	+ ₁	+ ₁	+ ₁	+ ₃
<i>C. mycoderma</i> WF-10 ⁴⁾	+ ₂	+ ₂	+ ₁	+ ₁	+ ₂	+ ₃
<i>H. anomala</i> H-1 ⁴⁾	+ ₂	+ ₂	+ ₂	+ ₁	+ ₁	+

+ : pellicle, + : ring or islets

The arabic numeral in table is time for film formation in days.

これらの結果から SM, ME, YEA, YEG 或いは WM を用いることにより *Pichia* 等のいわゆる産膜酵母(以後真性産膜性酵母 true film-forming yeasts と仮称する)及び *Saccharomyces* 等の産膜酵母(以後仮性産膜性酵母 pseudo film-forming yeasts と仮称する), 更にその中での非産膜性酵母と区別することが出来るわけである。しかし WM は培地としては不安定なので除外するのが適当と思われる。

尚産膜性と種々なる培養条件については別に報告する。

Ⅱ. 産膜性ブドウ酒酵母の分離

分離用培地・ブドウ果汁を硫酸を用いて pH 4.0~4.2 に調製し寒天 2.5% を加える。

資料・我国で現在最も多く栽培、醸造されている デラウエア 及び 甲州種を用いた。殺菌した大型試験管(長 18.0, 径 2.5 cm)に圃場に於て直接果房を 5 粒任意にとりその 5 資料づつを用いた。

方法・ブドウ果は試験管の中で良く破碎振盪した後殺菌水で適宜稀める。前述の果汁寒天培地にこの一定量を取りプロピオン酸ソーダを 0.2% になる様に加える。25°C に保ち 2 週間培養する。出現するコロニーは取除きつつ遅れて出現する酵母も出来るだけ採取する様にした。これらのプレートより任意に約 10% のコロニーをとり、純粋培養の後次の実験に供した。

Ⅲ. 産膜性酵母の分布について

実験Ⅱに於て分離した 106 菌株は SM, ME, YEA 及び YEG の各培地に培養、観察の結果次の様な 4 項にまとめた。即ち 1) 各培地に於ける産膜性及び非産膜性酵母, 2) 産膜性酵母に於ける有孢子及び無孢子酵母, 3) 産膜性酵母の属及び 4) それらの種についてである。(各菌株の分類学的研究及び産膜性等については次報で報告する)

結果及び考察・各分布状態は第 3~6 表に示した通りである。先づ用いた 4 培地に於ける産膜性は実験Ⅰで示されたと同様に SM 及び ME と YEA 及び YEG の間に明瞭な差が出て来た。即ち SM 及び ME で産膜するものは真性産膜性酵母であり分離菌の約 17% に当る。YEA 及び YEG に産膜しているものは真性産膜性と仮性産膜性酵母であり、これから真性産膜性酵母を差引いたものが仮性産膜性酵母 21 株となる。即ち総産膜性酵母は分離菌の約 37%, 仮性産膜性酵母は約 20% になり又真性及び仮性産膜性酵母は夫々総産膜性酵母の約 50% づつに当っている。次に有孢子及び無孢子酵母の関係は CASTELLI¹⁰⁾ も最近報告している様に分離菌では有孢子酵母の方が僅か乍ら多く、総産膜性酵母でも有孢子菌株が僅かに多い。有孢子系では仮性産膜性酵母が真性産膜性酵母よりはるかに

Table 3 Distribution of film-forming strains in various media

Isolated		Medium				Film-lacking strains
Strains	Sample	SM	ME	YEA	YEB	
Dela.	65	10	13	27	27	38
Kōshū	41	4	6	13	13	28
Total	106	14	19	40	40	66

多し *Saccharomyces* であるに反し、無孢子系ではこれに対応すべき産膜性の *Torulopsis* が発見されていないことによる。

分離された酵母の各属は 6 属にわたりこの中 *Torulopsis* はいづれの培地に於ても産膜しない。逆に *Pichia* 及び *Candida* では全分離菌がいづれの培地でも産膜した。*Saccharomyces* は最も多く分離され総菌株の約 60%, その中仮性産膜性酵母は総菌株の約 16%,

Table 4. Divisions of film-forming strains according to the spore forming ability

Total strains	106	Spore 70	Film strains 22	Non-film strains 48	Pseudofilm strains 17	True film strains 5
		No spore 36	Film strains 18	Non-film strains 18	Pseudofilm strains 4	True film strains 14

Table 5. Genera of film-forming yeasts

Genus	Isolated strains	Medium				Film-lacking strains
		SM	ME	YEA	YEG	
<i>Saccharomyces</i>	65	0	0	17	17	48
<i>Pichia</i>	5	5	5	5	5	0
<i>Candida</i>	9	9	9	9	9	0
<i>Kloeckera</i>	8	0	5	8	8	0
<i>Rhodotorula</i>	3	0	0	1	1	2
<i>Torulopsis</i>	16	0	0	0	0	16
Total	106	14	19	40	40	66

Table 6 Species of film-forming yeasts

Species	Isolated strains	Film-forming strains	Species	Isolated strains	Film-forming strains
<i>S. cerevisiae</i>	24	4	<i>P. membranae-faciens</i>	5	5
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	4	1	<i>C. mycoderma</i>	3	3
<i>S. oviformis</i>	11	8	<i>C. krusei</i>	5	5
<i>S. fermentati</i>	1	1	<i>C. tropicalis</i>	1	1
<i>S. rosei</i>	12	2	<i>Kl. apiculata</i>	8	8
<i>S. chevalieri</i>	3	1	<i>Rh. glutinis</i>	3	1
(<i>S. bayanus</i>)	8	0)	(<i>T. bacillaris</i>)	16	0)
(<i>S. steineri</i>)	2	0)	Total	106	40

Saccharomyces 中の約26%, 総産膜性酵母の約40%を占め更に仮性産膜性酵母中80%を占めている。即ち仮性産膜性酵母の大半が *Saccharomyces* と云うことが出来る。この他仮性産膜性酵母は *Kloeckera* 及び *Rhodotorula* の中にも少数存在している。次にこれらの species について検討すると分離菌は第6表の様に6属14種1変種に分けられたが、この中産膜性を示さなかつたものは *S. bayanus*, *S. steineri* 及び *T. bacillaris* の2属3種である。又真性産膜性酵母は3属5種、仮性産膜性酵母は3属7種1変種に属している。真性産膜性酵母は *P. membranaefaciens*, *C. mycoderma*, *C. krusei* 等で広く分離されているものである。仮性産膜性酵母の中最も数多く分離されたものは *S. oviformis* で、総菌株の約8%, 総産膜性酵母の約20%, 仮性産膜性酵母の約40%及び *S. oviformis* 中の約75%に達している。HOHL 等³⁾がシェリー酵母として分離したうちの約40%が *S. oviformis* で、一番多かつたことと比較して興味のあることである。*S. cerevisiae* は既に報告¹¹⁾¹²⁾¹³⁾されている様に我国に於ては数多く分離され本実験でも最も数多く分離された。しかしその中の仮性産膜性酵母は比較的少なく僅か4株であつた。*S. rosei* も分離株は *S. oviformis* と殆ど同数であるがその仮性産膜性酵母は2株に過ぎなかつた。その他 *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. fermentati* 及び *S. chevalieri* は分離株は少なかつたが夫々仮性産膜性酵母が存在した。その他の仮性産膜性酵母としては *Rh. glutinis* 1株、又通常産膜酵母と云われている *Kl. apiculata* の一部がこれに該当する様な結果となつている。シェリー酵母の中には *S. oviformis* と共に仮性産膜性の *Torulopsis*⁵⁾ が数多く発見されているが本実験では一般の野生酵母として認められている非産膜性の *T. bacillaris* が発見されたのみであつた。これらのことはシェリー酒などの醸造に於ける場合と一般的なブドウ酒の醸造に於ける酵母の分布に相違のあることを示しているものと思われる。

IV. 保存菌株に於ける仮性産膜性酵母

著者は先に国内に保存中のブドウ酒酵母、外国産 (FW) 52及び国内産 (JW) 51株の分類学的研究³⁾を行つたがこれらの各菌株についての産膜性を試験した。

実験方法・実験I及びIIIと同様に SM, ME, YEA 及び YEG の各培地を用いて行つた。

Table 7-1 Film formation of foreign wirn yeasts

Yeast No.			Medium			
			SM	ME	YEA	YEG
<i>S. cerevisiae</i>						
Group I	FW. 11	—	—	—	—	—
	" 48	—	—	+	+	+
Group II	FW. 14	—	—	—	—	—
	" 12	—	—	+	+	+
Group III	FW. 27	—	—	—	—	—
	" 1	—	—	+	+	+
	" 15	—	—	—	+	+
	" 31	—	—	+	+	+
	" 47	—	—	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>						
Group I	FW. 3	—	—	—	—	—
	" 2	—	—	+	+	+
	" 22	—	—	+	+	+
	" 51	—	—	+	+	+
Group II	FW. 32	—	—	—	—	—
	" 5	—	—	+	+	+
	" 8	—	—	+	+	+
Group III	FW. 9	—	—	—	—	—
	" 40	—	—	+	+	+
<i>S. oviformis</i>						
	FW. 26	—	—	+	+	—
	" 13	—	—	+	+	+
	" 38	—	—	+	+	+
	" 10	—	—	+	+	+
	" 16	—	—	+	+	+
<i>S. fermentati</i>						
	FW. 7	—	—	+	+	+
	" 6	—	—	+	+	+
	" 24	—	—	+	+	+
<i>S. rosei</i>						
	FW. 18	—	—	—	—	—

FW・11(FW・23,28,42,52), FW・14(FW・19,21,30,35,37,44,45,49),
FW・12(FW・36,46), FW27(FW・29,34,39,43), FW・1(FW・33),
FW・3(FW・4,17,25), FW32(FW・41), FW・9(FW・20)

結果及び考察・供試菌 103 株はいづれも SM 及び ME の両培地には産膜せず、YEA 又は YEG に於て産膜する菌株即ち仮性産膜性酵母が存在した。仮性産膜性即ち YEA 又は YEG に於ける結果を第 7 表に、属及び種との関係を第 8 表に示した。ただし ME では約半数の菌株が酵母環の形成があつた。YEA で完全産膜を認めたものは外国産 (FW) では 10 株、国内産 (JW) では 12 菌株で夫々の総数の約 20% 及び 25% に当る。この値は分離菌に於ける比率とほぼ等しい。しかしこれら保存菌株の皮膜は分離菌の皮膜と比較すると一般に薄く又不安定なものが多い。又産膜に要する日数も僅かに長かつた。供試菌はいづれも *Saccharomyces* で大半は *S. cerevisiae* 及び *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* であるが、これらの中の仮性産膜性酵母は 10% 内外で少ない。*S. oviformis*, *S. fermentati* 及び *S. chevalieri* の総数は非常に少ないがその仮性産膜性酵母の比率は高かつたこれらのことも分離菌の場合と一致した結果が得られている。

以上の様にシェリー酵母類似のブドウ酒酵母即ち *Pichia* 等の様に SM や ME に産膜せず YEA や YEG 或

Table 7-2 Film formation of Japanese wine yeasts

Yeast No.			Medium			
			SM	ME	YEA	YED
<i>S. cerevisiae</i>	Group I	J W. 36	—	— or +	—	—
	Group II	J W. 18	—	— or +	—	—
		// 3	—	+	+	+
		// 2	—	+	+	+
		// 9	—	+	+	+
		// 11	—	+	+	+
		// 16	—	+	+	+
	Group III	J W. 27	—	— or +	—	—
		// 5	—	+	+	+
		// 7	—	+	+	+
		// 13	—	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	Group I	J W. 17	—	— or +	—	—
		// 29	—	+	+	+
		// 48	—	+	+	+
	Group II	J W. 4	—	— or +	+	+
		// 1	—	+	+	+
	Group III	J W. 24	—	— or +	—	—
		// 22	—	+	+	+
		// 40	—	+	+	+
		J W. 42	—	—	—	—
<i>S. chevalieri</i>		// 12	—	+	+	+
		// 35	—	+	+	+
<i>S. heterogenicus</i>		J W. 14	—	—	—	—
		// 34	—	—	+	+
<i>S. steineri</i>		J W. 38	—	—	—	—

JW-18(JW-21,23,28), JW-3(JW-6,8,10,33), JW-27(JW-45,47,50),

JW-5(JW-15,20,46,49), JW-4(JW-19,25), JW-24(JW-32,37,41,51),

JW-22(JW-26,30,31), JW-38(JW-39,43,44)

いは WM に於て産膜する仮性産性酵母は比較的広く存在していることがわかる。

要 旨

ブドウ酒酵母を果汁などから分離しその産膜性及びこれらの分布について検討した。

1) ブドウ酒酵母は簡単な合成培地 (SM), 麦芽汁 (ME), 酵母エキスをういた人工培地 (YEA) 又はブドウ酒培地 (WM) など用いることにより, 全部の培地に産膜する *Pichia* 等のいわゆる 産膜酵母 (真性産膜性酵母) 及び YEA や WM のみに産膜する *Saccharomyces* 系の仮性産膜性酵母更に非産膜性の酵母とに分けることが出来た。

2) このことからブドウ酒酵母に於ける産膜性酵母の分布を検討した結果総分離菌に対する産膜性酵母は約37%, 仮性産膜性酵母は約20%であつた。又産膜性酵母中の仮性産膜性酵母は約50%であつた。

3) 分離菌 106 株は 6 属14種 1 変種であつたがその中真性産膜株は 3 属 5 種, 仮性産膜株は 3 属 7 種 1 変種及び非産膜株は 2 属 3 種となつた。仮性産膜性酵母の大半は *Saccharomyces* に属し, この中 *S. oviformis* が最も多く仮性産膜性酵母中の約40%に達している。

4) 保存中のブドウ酒酵母103株 (*Saccharomyce* 属) についても同様な実験を行つた結果、約20%が仮性産膜性酵母に属し分離菌と同様な傾向を示した。

終りに種々御指導下さいました山梨大学六所先生、横塚先生、東大応微研飯塚助教教授に深く感謝致します。又有意義な御助言を戴きました東大応微研駒形学兄に感謝致します。

文 献

1) PIETRIS SCRIVARRI : Arch. Mikrobiol. **10**, 446 (1939) 2) BARRET, A., P. BIDAN and L. ANDRE : Compt. rend. acad. agrie. France 426 (1955) 3) CLEMENT TARANTOLA : Ann. reale accad. agr. Torino **88**, 61 (1945) 4) 横塚, 後藤 : 農化, **29**, 39, 42, 123 (1955) 5) HOHL, L.H. and CRUESS, W.V. : Zentr. Bakterirol. Parasitenk. Abt. II **101**, 65 (1939) 6) W.V. CRUESS : Calif. Expt. Sta. Bull., 710 Oct. (1948) 7) 後藤, 横塚 : 未発表 8) 後藤, 横塚 : 醸工誌, **34**, 537(1956), **35**, 1 (1957) 9) 坂口, 森, 鎮目 : 農化, **13**, 713 (1937) 10) T. CASTELLI : A. J. Enology **8**, 149 (1959) 11) 坂口謹一郎 : 園芸誌, No. 11, 1 (1946) 12) 後藤, 横塚 : 昭和28年7月, 農化会, 口演. 13) 小原, 野々村 : 農化 : **30**, 524, (1956) (昭和34.7.8受理)

Table 8 Pseudo film-forming yeasts in the stock cultures

Species	Total strains	Pseudo-film strains
Foreign wine yeasts		
<i>S. cerevisiae</i>	29	3
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	14	3
<i>S. oviformis</i>	5	2
<i>S. fermentati</i>	3	2
<i>S. rosei</i>	1	0
Japanese wine Yeasts		
<i>S. cerevisiae</i>	25	6
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	17	4
<i>S. chevalieri</i>	3	2
<i>S. steineri</i>	4	0
<i>S. heterogenicus</i>	2	0

産膜性のブドウ酒酵母について (第2報)

分離酵母の分類及び仮性産膜酵母の分類学的特徴

後 藤 昭 二 (山梨大学醸酵研究所)

緒 言

前報¹⁾に於て106株のブドウ酒酵母を果汁等より分離し産膜性酵母特に仮性産膜性酵母の分布状態を報告した。本報ではこれら分離菌の同定を LODDER ら²⁾の分類方式に準じて行い更に仮性産膜性酵母の特徴等について報告する。

実 験

各実験の方法は全て LODDER ら²⁾の方法に従つた。尚孢子形成培地には醋酸ソーダ培地をも併用した。YEA³⁾に於ける産膜期の細胞及び産膜性：培地及び条件は全て前報と同様で細胞の観察は、3日目及び14日目に夫々行なつた。

実験結果・各実験の結果は1~4表に示した。尚非産膜性の酵母は各代表菌のみを記載した。

類縁, 同定及び考察

Sacch. cerevisiae HANSEN

DS-1, 2, 3, KS-1 (産膜性), D.001 (非産膜性)

これらはいづれも細胞の大きさからこの Species の Group II に属するものである。産膜性の4株はいづれも孢子形成時に於て Conjugation tube 様の突出を出すがかしし接合はない。そして非産膜性の酵母に於ては Conjugation tube 様突出を出すものはなかつた。又斜面培養の面に於ても産膜株と非産膜株との間には差がみられた。即ち前者は曇つた粗面を呈しているが後者では一般に光沢のある平滑面である。産膜株では YEA 培地に於て2日目に完全皮膜を形成し、この皮膜細胞は最初は麦芽汁に於けると同様な形態を示すが稍々小型にな

Table 1 Morphological properties

Yeasts No.	Cells in malt-ext. (μ)		Streak culture on malt agar	Slide culture	Spores	
D S. 1	rd-ov	(3.5~6.5)(5.5~9.5)	y-b, ub, ud, rh, dl	—	rd-ov	1~4*
" 2	"	(3.5~6)(3.5~9.5)	y-g, ft, es, rh, dl	—	"	" "
" 3	"	(3.5~6.5)(4~12)	cm, ub, es, rh, dl	—	"	" "
" 4	ov-lo	(3.8~6.5)(5.5~15)	g, ft-rs, ud, rh,	+	rd	1~3
" 5	rd-ov	(3.5~6.5)(4.5~11)	cm, ub, es, rh, dl	+	rd-ov	1~4*
" 6	"	(4~6.5)(4.5~9)	"	—	"	" "
" 7	"	(4~9)(4.5~12)	y-g, co, et, rh, dl	+	"	" "
" 8	"	(4~8)(5~11)	y-g, ub, es, sm, gl	—	"	" "
" 9	"	(3.5~8)(4~10.5)	"	—	"	1~4
" 10	rd	(3~8) ²	"	—	"	"
" 11	rd-ov	(3.5~4)(5.5~10.5)	y-g, ub, et, sm, gl	—	"	1~4*
" 12	ov-rd	(4~6)(4.5~8)	y-g, ud, ft-rs, sm, gl	+	ov-rd	1~2
K S. 1	rd-ov	(3.5~8)(4~12)	y-g, co, et, rh, dl	—	rd-ov	1~4*
" 2	"	(3~6.5)(4~10.5)	y-g, ub, et, sm	—	"	1~3
" 3	"	(4~8)(4.5~12)	y-g, co, et, rh, dl	—	"	1~4*
" 4	"	(3.5~8)(4~10.5)	y-s, co, es, rh, dl	—	"	1~4
" 5	ov	(3.5~5.5)(5~10.5)	"	—	"	1~4*
D P. 1	ov-cyl	(2.5~8)(8~10)	y-b, rs, es, wk	+	rd-ss	1~2
" 2	"	(3~8)(8~14)	"	+	"	1~4
" 3	ov	(4~6)(5~10)	b-g, ud, et, sm	+	"	1~4
" 4	ov-lo	(4~6)(6~14)	g, co, es, wk-rh	+	—	—
" 5	ov-cyl	(2~4)(6~13)	g, co, ud, rh	+	—	—
" 6	ov	(3~4)(5~8)	b-g, ft, es, sm-rh	+	—	—
" 7	ov-cyl	(2.5~4)(4~10)	"	+	—	—
" 9	rd-ov	(2~4)(4~6)	"	+	—	—
" 9	lo-cyl	(3~5)(8~14)	"	+	—	—
" 10	ov	(2.5~4)(3~6.5)	"	—	—	—
K P. 1	lo-cyl	(2.5~6)(7~12)	g-b, co, ud, wk	+	rd-ss	1~4
" 2	ov	(3~5)(5~9)	g, rs, ud, sm	+	—	1~3
" 3	ov-cyl	(3~6.5)(7~11)	g-y, co, ud, rh	+	—	—
" 4	ov	(3~6)(6~10)	"	+	—	—
D K. 1	ov-lm	(1.5~4.5)(3.2~7)	y-b, ft, et, sm	—	—	—
" 2	lm-ov	(0.8~2)(4~10)	b-g, ft, et, sm	—	—	—
" 3	lm	(2~4)(4~9)	g, ft, ud, rh-sm	—	—	—
" 4	ov-lm	(0.8~3)(4~9)	"	—	—	—
K K. 1	lm-ov	(0.8~6)(6~21)	y-g, ft, ud, rh-sm	—	—	—
" 2	"	(1.2~6)(6~18)	y-g, ft, et, sm	—	—	—
" 3	ov-lm	(2~6)(4~8)	g, ft, ud, sm-rh	—	—	—
" 4	"	(1.8~5)(4.5~9)	y-g, ft, et, sm	—	—	—
D R. 1	rd-ov	(2.5~5)(4.5~7)	orang to red, ft, et, sm-rh	—	—	—
D.001	"	(3~9.5)(3.5~10.5)	g, rs, es, sm, gl	—	rd-ov	1~3
" 011	ov	(4~6)(4.5~12)	cm, ft-rs, ud, sm, gl	+	rd	1~4
" 031	rd-ov	(3.5~5)(3.8~8)	y-g, rs, ud, rh	+	"	1~2
" 051	rd	(3~7.5) ²	cm, rs, et, sm, gl	—	"	1~2*
" 051	rd-ov	(4.5~6)(5~10)	g, ft, et, sm, gl	—	"	1~4

// 071	lo-ov	(4~6.5)(7~12)	y-g, ud, es, sm, gl	+	rd-ov	1~3
// 081	ov-lo	(4.5~6)(5.5~12)	cm, ft, ud, rh	+	//	1~4
D T. 01	ov	(2~4)(3~5)	g, ft, et, sm	-	-	

rd : round, ov:oval, lo:long-oval, cyl:cylindrical, lm:lemon, y:yellow, b:brown, g:grey, cm:cream-colored, ub:unbonate, ft:flat, rs:raised, co:convex, ud:undulate, es:erose, et:entire, rh:rough, sm:smooth, wk:wrinkled, dl:dull, gl:glistening, ss:semispherical.

※ conjugationtube.

Table 2 Physiological properties

Yeast No.	Fermentation						Assimilation							Splitting of arbutin
	Gl	Ga	Su	Ma	La	Rf	Gl	Ga	Su	Ma	La	KNO ₃	EtOH	
D S. 1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
// 4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
// 5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
// 10	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
// 11	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
// 12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
D 071	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
// 081	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
D P. 1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
// 4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
// 6	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
// 10	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
DK. 1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
DR. 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
D T. 01	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-

Gl : Glucose, Ga : Galactose, Su : Sucrose, Ma : Maltose, La : Lactose, Rf : Raffinose

DS-1(DS-2,3,KS-1, D-001), DS-4(D-011), DS-5(DS-6,7,8,9, KS-2,3,4, D-031),

DS-11(KS-5, D-051), DS-12(D-061), DP-1(DP-2,3, KP-1,2),

DP-4(DP-5, KP-3), DP-6(DP-7,8,9, KP-4),

DK-1(DK-2,3,4, KK-1,2,3,4)

つている。時日の経過と共に細胞は全て円型となり大型になつてきている。

Sach. cerevisiae HANSEN var. *ellipsoideus* (HANSEN) DEKKER

DS-4 (産膜性), D-011 (非産膜性)

DS-4 は Group I に D-011 は Group II に属す。この Species では産膜株も孢子形成時 Conjugation tube 様突出を出さず又斜面培養に於ても非産膜株との間に差は認められなかつた。YEA に於ける皮膜は分離した産膜株中最も不安定なものの一つであつた。皮膜細胞は 14 日目に於て大円型の傾向を示し round~short oval となつている。

Sacch. oviformis OSTERWALDER

DS-5,-6,-7,-8,-9, KS-2,-3,4 (産膜株),

D-031 (非産膜株)

これらはグルコース, 蔗糖, マルトース及びラフィノーズを醗酵, 資化するが, 細胞が oval~round 又 primitive な凝菌糸を形成するので *S. fermentati* や *S. bayanus* と区別し *S. oviformis* と同定される。産膜株のうち

Table 3 Film formation in various media

Yeast No.	Medium				Yeast No.	Medium			
	SM	ME	YEA	YEG		SM	ME	YEA	YEG
DS. 1	—	+	++	+	DP. 9	+	++	++	++
" 2	—	+	++	+	" 10	+	+	++	++
" 3	—	+	++	+	KP. 1	+	++	++	++
" 4	—	+	+	+	" 2	+	++	++	++
" 5	—	+	++	+	" 3	+	++	++	++
" 6	—	+	++	+	" 4	+	++	++	++
" 7	—	+	++	+	DK. 1	+	+	+	+
" 8	—	+	++	+	" 2	+	+	+	+
" 9	—	+	++	+	" 3	+	+	+	+
" 10	—	+	++	+	" 4	+	+	+	+
" 11	—	+	++	+	KK. 1	+	+	+	+
" 12	—	+	++	+	" 2	+	+	+	+
KS. 1	—	+	++	+	" 3	+	+	+	+
" 2	—	+	++	+	" 4	+	+	+	+
" 3	—	+	++	+	DR. 1	—	+	+	+
" 4	—	+	++	+	D. 001	—	—	—	—
" 5	—	+	++	+	D. 011	—	+	—	—
DP. 1	+	++	++	++	D. 031	—	+	+	+
" 2	+	++	++	++	D. 051	—	—	—	—
" 3	+	++	++	++	D. 061	—	+	—	—
" 4	+	++	++	++	D. 071	—	—	—	—
" 5	+	++	++	++	D. 081	—	—	—	—
" 6	+	++	++	++	DT. 01	—	+	—	—
" 7	+	++	++	++					
" 8	+	++	++	++					

— : no pellicle, + : ring or small islets, + : thin pellicle, ++ : pellicle

5株は孢子形成時に Conjugation tube 様突出を形成し又斜面培養の面は曇った粗面をなしている。一方 DS・9; KS・2 及び 4 の3株は Conjugation tube 様突出を形成せず斜面培養は光沢のある平滑面で非産膜株と同様な形態であつた。YEA に於ける皮膜は比較的安定でありその細胞は14日目には全て round であつた。

Sacch. fermentati (SAITO) LODDER et VAN-RIJ

DS・10

本菌は細胞が round, 凝菌糸を形成しないことなどから *S. oviformis* から区別された。LODDER²⁾らは *S. fermentati* は孢子形成時 Conjugation tube 様突出を形成する様記載しているが DS・10 ではこれが認められなかつた。

Sacch. rosei (GUILLIERMOND) LODDER et VAN-RIJ

DS・11, KS・5 (産膜性), D・051 (非産膜性)。

産膜株が孢子形成時 Conjugation tube 様突出を認めたと同様非産膜株でも全て Conjugation tube 様突出の形成が認められた。斜面培養に於ける面では *S. cerevisiae* 或いは *S. oviformis* の様に産膜株と非産膜株の間に明らかな差を認めなかつた。YEA に於ける皮膜細胞は大円型化している。

Sacch. chevalieri GUILLIERMOND

DS・12 (産膜性), D・061 (非産膜性)

DS-12はガラクトースを僅か乍ら醗酵する。細胞は oval, 凝菌糸を良く形成するので *S. elegans* と区別された。DS-12は孢子形成時 Conjugation tube 様突出を形成せず又斜面培養の形態でも非産膜株と大差なかった。唯 YEA に於ける皮膜細胞は他の産膜株と同様大円型の傾向が認められた。

Sacch. bayanus SA-CCARDO D-071.

細胞が oval~long-oval で良く凝菌糸を形成すること等から *S. fermentati* 及び *S. oviformis* と区

別されたが産膜株は発見されなかつた。

Sacch. steineri LODDER et VAN-RIJ・D-081

本菌はラフィノーズを醗酵しないことから *S. cerevisiae* や *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* から区別された。この species の産膜株も発見出来なかつた。

Pichia membranaefaciens HANSEN・DP-1,・2,・3, KP-1,・2

著者は³⁾先にブドウ酒産膜酵母の分類で *P. memb.* を形態的な差で3群に大別したがこれによると DP-1,2, KP-1 の3株は “wrinkled”, DP-3, KP-2 の2株は “smooth” type として分けられた。

Candida mycoderma (REESS) LODDET et VAN-RIJ DP-4,・5, KP-3

この3株も前の *P. memb.* と同様, DP-5 KP-3 は “rough”, DP-5 は “wrinkled” type とに区別する事が出来た。

Candida krusei (CAST.) BERKHOUT・DP-6,・7,・8,・9, KP-4

以上5株はグルコースを資化, 醗酵し又各培地に於て良く産膜するなど *C. krusei* と同定された。

Candida tropicalis (CAST.) BERKHOUT・DP-10

この species は先に著者の分離した³⁾ものと殆ど同じ形態であるが一般には余りブドウ酒などからは分離されていないものである。

Kloeckera apiculata REESS

DK-1,・2,・3,・4, KK-1,・2,・3,・4

以上8株の無孢子酵母は細胞は小型でレモン状を呈し, グルコースのみを資化醗酵し, KNO_3 を資化せずアルブチンを分解しないこと等からいづれも *Kl. apiculata* と同定された。麦芽汁で皮膜形成のあつたものは DK-1,・2,・3, KK-1,・2 で又 YEA ではいづれも完全産膜をせず, YEG でのみ産膜した。これはこの酵母のアルコール耐性とも関係のあることと思われる。

Rhodotorula glutinis (FRES.) HARRISON・DR-1,

Table 4. Cells of film stage in YEA-medium

Yeast No.	After 4 days	After 14 days
DS. 1	rd-ov (2.8~7.5)(2.8~9)	rd (6~10) ²
“ 2	“ “	rd (5.5~10) ²
“ 3	“ (2.8~7.5)(3~7.5)	“ (6~12) ²
“ 4	ov-lo (2.8~6)(4~14)	rd-ov (3.5~8)(3.5~14)
“ 5	rd-ov (2.8~6)(4.5~7.5)	rd (5.5~11) ²
“ 6	“ “	“ “
“ 7	“ (3~5)(4.5~10)	“ “
“ 8	“ (3~6)(4.5~9.5)	“ “
“ 9	“ “	“ “
“ 10	rd (2.5~7.5) ²	“ (3~8.5) ²
“ 11	rd-ov (2.8~7.5)(2.8~9)	“ (4.5~10) ²
“ 12	ov-rd (3~5)(3.5~7.5)	“ (4~9) ²
KS. 1	rd-ov (2.8~7.5)(3~10)	“ (6~11) ²
“ 2	“ (2.8~6)(3~7.5)	“ (6.5~9) ²
“ 3	“ (3~7)(3~9)	“ (6~11) ²
“ 4	“ (2.8~6.5)(3~7.5)	“ “
“ 5	ov (2.8~4.5)(4~7.5)	rd-ov (4.5~10) ²
DP. 1	ov-lo (2.5~2.8)(6.5~7.5)	lo-cyl(ov) (2.0~2.5)(6~7)

DR-1 はカロチノイド性色素を生産する。細胞は round~oval, 醗酵性なくグルコース, ガラクトース, 蔗糖, マルトース, KNO_3 を資化し又アルブチンを分解するので *Rh. glutinis* と同定した。本菌は麦芽汁で産膜しないが YEA 及び YEG では産膜した。しかし皮膜は不安定であつた。

Torulopsis bacillaris (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER DT-1

本菌は広く野生酵母⁹⁾として認められているものであるがいづれの培地に於ても皮膜の形成はなかつた。

以上分離菌の同定を各実験にもとづいて行つた。分類学的な実験に於ける生理的性質より仮性産膜性酵母の特徴を明確にすることは出来なかつた。しかし形態的特徴は仮性及び非産膜株間に差が認められた。即ち *S. cerevisiae* 或は *S. oviformis* の項でも述べた様に一般に仮性産膜株は孢子形成時に Conjugation tube 様突出を形成し又斜面培養の面は曇つた粗面をなしているが非産膜株では Conjugation tube 様突出の形成はなく又斜面培養は光沢のある平滑面をなしている。この様なことからこの両性質間には或る程度の関係があるものの如くである。唯例外もあり特に *S. rosei* ではこれらの関係は成立していない。

大西⁹⁾は滲透圧性酵母の食塩培地に於ける産膜株を他の性質などからも変種とした。しかしブドウ酒酵母に於ける仮性産膜株は上述の様な形態的な相違のみでは、他の生理的性質を検討の上でないと分類学上いかに取扱うかは断定出来ない。これらのことは目下研究を続行中である。

YEA に於ける皮膜及び細胞・仮性産膜株は YEA に於ていづれも 2~3 日目に完全産膜をなしその皮膜細胞は産膜当初は ME に於けると同様な形状を示すが稍々小型化している。しかし時日の経過と共に細胞形は round になり又大型化している (Table 4)。又各細胞は既に産膜初期よりブロック状をなしている。即ち仮性産膜株の皮膜は円型細胞のブロック状によつて形成されているものと認められる。一方 *Pichia* 等の真性産膜株ではいづれの培地に於ける皮膜細胞もブロック化はしているが、その形状は麦芽汁に於けると同様でそれ程の差が認められなかつた。

要 旨

1) 先に果汁等より産膜菌株を中心として分離したブドウ酒酵母の分類, 同定を Lodder らの方式に従つて行い次の 6 属 14 種 1 変種を得た。

<i>Sacch. cerevisiae</i>	24	<i>P. membranaefaciens</i>	5
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	4	<i>C. mycoderma</i>	3
<i>S. oviformis</i>	11	<i>C. krusei</i>	5
<i>S. fermentati</i>	1	<i>C. tropicalis</i>	1
<i>S. rosei</i>	12	<i>Kl. apiculata</i>	8
<i>S. chevalieri</i>	3	<i>Rh. glutinis</i>	3
<i>S. bayanus</i>	8	<i>T. bacillaris</i>	16 strains
<i>S. steineri</i>	2		

2) 仮性産膜株と非産膜株との間には或る程度の形態的な差が認められた。即ち一般に前者は孢子形成時 conjugation tube 様の突出を形成し又斜面培養の面は曇つた粗面であつた。

3) YEA 培地に於て仮性産膜株は 2~3 日目に皮膜を形成し又その皮膜細胞は円型, 大型化し更にブロック状となつてゐる。

終りに種々御指導下さいました山梨大学六所文三先生, 横塚勇先生, 東大応微研飯塚広助教授に深く感謝致します。又有意義な御助言を戴きました東大応微研駒形学兄に感謝致します。

- 1) 後藤昭二: 本誌, 37, 384 (1959) 2) LODDER, VAN-RIJ: The Yeasts (1952) 3) 横塚勇, 後藤昭二: 農化 29, 42 (1954) 4) H. SCHANDLER: Die Mikrobiologie des Weins. Stuttgart (1950) 5) 小原巖, 野々村英夫: 農化: 30, 524 (1956) 6) H. OHNISHI: Bull. Agri. Chem. Soci. Japan. 21, 151 (1957) (昭和34, 6, 11受理)

